

CRISPR/Cas システムを用いたアレル特異的ゲノム編集とラット毛色突然変異の修復！

真下知士（ましもともし）特定准教授、吉見一人（よしみかずと）特定研究員ら、医学研究科附属動物実験施設の研究グループは、新しいゲノム編集技術 CRISPR/Cas を利用して、ラットの毛色に関わる遺伝子変異にさまざまなゲノム編集を行うことに成功しました。

近年、細菌や古細菌の獲得免疫機構として発見された CRISPR/Cas システムが、さまざまな生物種の細胞や個体における新しいゲノム編集技術として、注目されています。本研究では、この CRISPR/Cas システムを利用して、ラット毛色に関わる遺伝子変異（一塩基置換、数塩基の欠失変異、レトロトランスポゾン挿入変異）を修復することで、白色から野生色に戻すことに成功しました。また、CRISPR/Cas の認識特異性を利用することで、父親（あるいは母親）由来の片側アレルだけを遺伝子改変する「アレル特異的ゲノム編集」にも成功しました。



1. 研究背景

実験用ラットは、高血圧、糖尿病、がん、てんかん、神経変性など様々なヒト疾患のモデル動物として利用されています。近年、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）や TAL エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）と呼ばれる人工ヌクレアーゼを利用することで、ヒト疾患の遺伝子を破壊したノックアウトラットの作製が可能となり、ヒト疾患モデル動物として、さまざまなノックアウトラットが利用されています。

一方で、最近の次世代ゲノムシーケンシング技術の進歩により、ヒト疾患の原因は遺伝子の完全な欠失（ノックアウト）だけでなく、一塩基多型（SNP）、小さな塩基配列の挿入欠失変異（indel）、遺伝子のコピー数多型（CNV）などが関与していることが明らかとなっています。こうしたさまざまなヒト遺伝子変異に対応するモデル動物を作製するためには、さらに効果的な遺伝子改変技術が必要とされています。

CRISPR/Cas（Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat/CRISPR-associated）システムは、細菌や古細菌の持つ獲得免疫機構として発見されました。近年、さまざまな生物種の細胞や個体における新しい遺伝子改変ツールとして、利用されるようになってきました。本研究では、この CRISPR/Cas システムを実験用ラットに利用することで、ラット個体におけるさまざまなゲノム編集を行いました。

2. 本研究の成果（概要）

1) ラットにおける CRISPR/Cas ゲノム編集プラットフォームの開発

ラットチロシナーゼ（*Tyr*）遺伝子を標的とするガイド RNA（gRNA）、Cas9 ヌクレアーゼ（Cas9）を作製して、ラット線維芽細胞株（Rat-1 細胞）、あるいはウイスター系ラットの受精卵に導入することで、*Tyr* 遺伝子のノックアウト、および 1 塩基多型（SNP）のノックインに成功しました（図 1）。

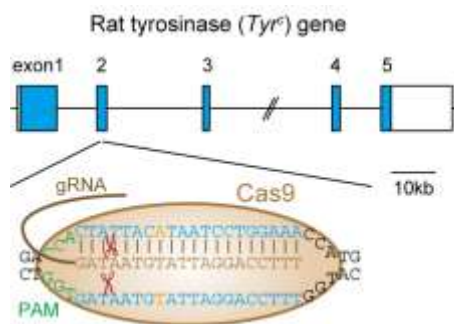
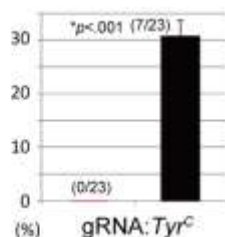
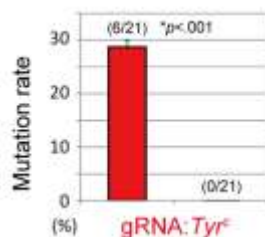


図1: (左) ラット *Tyr* 遺伝子の第2エクソンを標的として作製された gRNA と Cas9。(右) CRISPR/Cas システムにより Rat-1 細胞の *Tyr* 遺伝子に変異が挿入（ノックアウト）された。Cel-I ヌクレアーゼを利用した Surveyor Assay により二本バンド（矢印）として検出されている。

2) アレル特異的ゲノム編集

ラットアルビノ（ヒトでは先天性白皮症）は、*Tyr* 遺伝子の第2エクソンの一塩基置換変異によって起きることが報告されています。この一塩基多型（SNP）に対して、2種類の gRNA を作製することで、CRISPR/Cas システムがこの SNP を特異的に認識することが可能であることを発見しました。さらに、この CRISPR/Cas の SNP 認識特異性を利用することで、白色アルビノ F344 ラット（母親）と有色アグーチ DA ラット（父親）の間の F1 ラット（子供）において、母親由来遺伝子だけを遺伝子改変（ノックアウト）、あるいは父親由来遺伝子アレルだけをノックアウトする‘アレル特異的ゲノム編集’に成功しました。



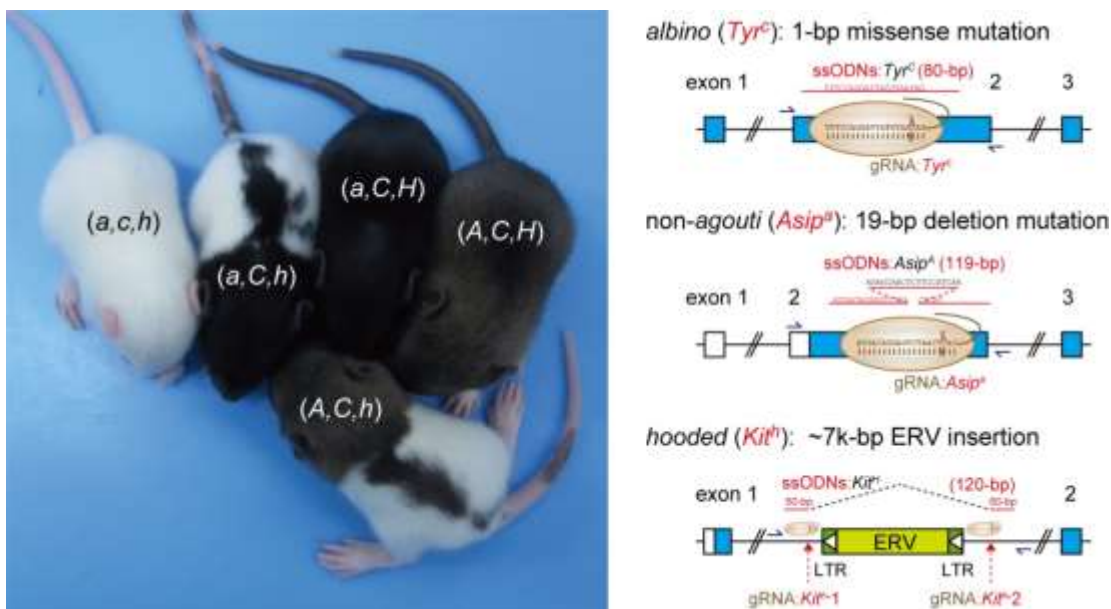
■ : F344-allele (*Tyr*^c)
■ : DA-allele (*Tyr*^c)

図2: F1 (F344 X DA) ラットにおけるアレル特異的ゲノム編集。CRISPR/Cas は、F1 個体において、100%特異的に母親（左）、あるいは父親（右）由来のアレル遺伝子を編集している。

3) ゲノム編集によるラット毛色パターンの修復

実験用ラットの毛色遺伝子の変異として、1) アルビノ（白色）*c* : *Tyr* 遺伝子の一塩基置換、2) ノンアグーチ（黒色）*a* : *Asip* 遺伝子の 19 塩基欠失、3) フード（頭巾班）*h* : *Kit* 遺伝子のレトロトランスポゾン（7-Kb）挿入変異などが知られています。CRISPR/Cas システムと一緒に、一本鎖オリゴヌクレオチド（ssODN）を利用することで、三つの異なるラット毛色突然変異をゲノム編集して、ラットの毛色表現型を白色から野生色に修復することに成功しました（図3）。

図 3: CRISPR/Cas システムにより、アルビノ (白色) 変異: 一塩基置換 (*c*)、ノンアグーチ (黒色) (*a*) : 19 塩基欠失、フード (頭巾班) : レトロトランスポゾン (7-Kb) 挿入変異 (*h*) の遺伝子突然変異が修復された。



3. 今後の期待

CRISPR/Cas システムを利用することで、今まで以上に簡便、迅速かつ自由に遺伝子改変ラットの作製が可能になりました。さらには、ssODN を用いてノックインラットも作製できるため、ヒト疾患で同定された SNP 変異をラットゲノムに正確に反映させた遺伝子改変ラットを作製することも可能となります。CRISPR/Cas システムは、様々な用途に対する優れた遺伝子改変ツールとして、急速に世界中で広がっています。また、ラットに限らず、ES 細胞がなく遺伝子改変が困難であった中大動物にも応用できることから、今後様々なモデル生物で利用されることが考えられます。

私達は、研究者の要望に応じてゲノム編集技術を用いた遺伝子改変ラットの作製を支援しています (<http://www.anim.med.kyoto-u.ac.jp/gma>)。また、ラットのリソース機関としてナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」を運営しています。今後、有用な遺伝子改変モデルが世界中で開発され、リソース機関を通じて世界中の研究者へ提供されることで、より一層モデル生物の利用価値を高め、医学生物学研究の発展に貢献していくことができると期待しています。

4. 掲載論文

雑誌名 Nature Communications (英国ネイチャー出版グループ オープンアクセス誌)

<http://www.nature.com/naturecommunications>

[DOI]  10.1038/ncomms5240

論文名

Allele-specific genome editing and correction of disease-associated phenotypes in rats using the CRISPR-Cas platform

「CRISPR/Cas システムによるアレルト異的ゲノム編集とラット疾患関連変異の修復」

著者名

Kazuto Yoshimi, Takehito Kaneko, Birger Voigt, Tomoji Mashimo

吉見 一人、金子武人、Voigt Birger、真下 知士

著者所属機関名

Institute of Laboratory Animals, Graduate School of Medicine, Kyoto University

京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設

研究助成

本研究の一部は、以下の事業の助成を受けて実施されました。

- 独立行政法人日本学術振興会 科学研究費助成事業（基盤研究(B)）
「実験用ラットにおけるゲノム編集基盤技術の開発」（課題番号：26290033、代表：真下知士）
- 独立行政法人日本学術振興会 科学研究費助成事業（研究活動スタート支援）
「新規遺伝子改変技術 CRISPR/Cas9 を用いた多重遺伝子ノックアウトラットの作製研究」（課題番号：25890011、代表：吉見一人）
- F344/Stm ラット（NBRP-Rat No.0140）、DA/Slc ラット（NBRP-Rat No.0157）、PVG/Seac ラット（NBRP-Rat No.0080）は、文部科学省中核的拠点整備プログラム「ナショナルバイオリソースプロジェクトーラット（NBRP-Rat）」から提供を受けました。